

# Periodontal Regeneration by Allogeneic Transplantation of Adipose-tissue Derived Multi-Lineage Progenitor Stem Cells in vivo.

著者	VENKATAIAH VENKATA SURESH
号	50
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	歯博第840号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00126844">http://hdl.handle.net/10097/00126844</a>

氏名(本籍) : VENKATAIAH VENKATA SURESH (インド)

学位の種類 : 博士 (歯学) 学位記番号 : 歯博第840号

学位授与年月日 : 2019年3月27日 学位授与の要件 : 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻 : 東北大学大学院歯学研究科(博士課程) 歯科学専攻

学位論文題目 : Periodontal Regeneration by Allogeneic Transplantation of Adipose-tissue Derived Multi-Lineage Progenitor Stem Cells in vivo. (脂肪由来多系統前駆細胞他家移植による歯周組織再生能力の解析)

論文審査委員 : (主査) 教授 山田 聡  
教授 福本 敏 教授 齋藤 正寛

## 論文内容要旨

**Objectives:** The ultimate goal of periodontal disease treatment is the reorganization of functional tissue by the application of stem cells, cytokines and extracellular matrices that can regenerate the lost periodontal tissue. Regeneration of periodontal tissues is being clinically possible by using autologous transplantation of mesenchymal stem cells (MSC). However, autologous MSC transplantation is limited due to depending on age, systemic disease and tissue quality, thus precluding their clinical application. Therefore, we evaluated the efficacy of allogeneic transplantation of pig derived adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells (ADMPC) in a micro-mini pig periodontal defect model.

**Methods:** ADMPC were isolated from greater omentum of micro-mini pig (2014DnA-036-3). Flow cytometry analysis was performed to analyze the MSC marker expression on ADMPC. Osteogenic, adipogenic and periodontal ligament differentiation ability was investigated to assess multi-lineage differentiation ability. Pig gingival fibroblast was also isolated from gingival tissue of micro-mini pig and used as control group. To investigate the immune-modulatory activity of ADMPC, cells were cultured with cytokine cocktail containing interferon (IFN)- $\gamma$  tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-6 for 7 days. To investigate the effect of inflammatory cytokines on cell growth of ADMPC, cells cultured with cytokine cocktail were examined for cell proliferation using cell counting kit -8 (CCK-8). To assess the immunomodulatory effect of ADMPC, real-time PCR was performed in cells cultured with and without cytokine cocktail and investigated the expression of immune suppressive factors, guanylate binding proteins (GBP4), C-X-C motif

chemokine (CXCL10) and IL1 receptor antagonist, and inflammatory cytokines IL-10, IL-6, IL-17 and TNF- $\alpha$ . Periodontal defect models were established in a micro-mini pig and transplanted with allogeneic or autologous ADMPC. Computed tomography and histological analysis were used to evaluate the outcome of periodontal tissue regeneration.

**Results:** Flow cytometry analysis confirmed that ADMPC express moderate to high levels of MSC markers including CD44 and CD73. ADMPC exhibit osteogenic differentiation ability by calcified nodule formation, alkaline phosphatase staining and expression of osteogenic related genes in the induced cells. Adipogenic differentiation of ADMPC confirmed by the formation of lipid Droplets stained with Oil Red O in the induced cells. ADMPC showed high expression of immune-suppressive factors GBP4 and IL1-RA upon treatment with cytokine cocktail. Allogeneic transplantation of ADMPC induced significant periodontal tissue regeneration in micro-mini pig periodontal defect model and regeneration ability was comparable to those of autologous transplantation by  $\mu$ CT and histological analysis.

**Conclusion:** These results suggested that ADMPC has an immune-modulation and periodontal tissue regeneration ability following allogeneic transplantation. Thus, allogeneic transplantation of ADMPC has a potential to become an alternative to periodontal regeneration therapy by autologous transplantation.

**Key words:** Periodontal inflammation, Micro-mini pig, Allogeneic ADMPC, Periodontal regeneration, Immune-modulation

## 審査結果要旨

本論文は全身疾患等の有病者を有する歯周病に対する再生医療の適応範囲を拡大するために、脂肪由来多系統前駆細胞を用いた他家移植による歯周組織再生効果を調べた内容である。歯周病は炎症性崩壊を引き起こす慢性炎症であり、特に中高年齢層で重篤な骨欠損を伴う歯周組織崩壊によって咀嚼機能を失う最大の原因となる。歯周炎で失われた歯周組織の機能回復を図る目的に幹細胞移植療法による歯周組織再生療法の臨床研究が推進されている。この幹細胞移植療法のさらなる適応拡大のため、自家移植に加え他家移植の可能性が検討されている。近年では、他家移植による間葉系幹細胞の免疫調節作用を利用した抗炎症療法が開発され、自己免疫疾患、白血病等の治療を対象とした臨床研究が進められている。歯周組織再生療法においても間葉系幹細胞の他家移植による抗炎症療法の有効性は既に報告されており、自家移植が実施できない全身疾患を有する患者に対して適応が期待される。

本論文では、脂肪組織由来多系統前駆細胞 (adipose tissue-derived multilineage progenitor cells; ADMPC) を用いた他家移植による再生医療技術の開発を目指すことを目的として、マイクロミニブタを用いた ADMPC の他家移植モデルを開発し、歯周組織再生能力の検証を行った。マイクロミニブタ由来 ADMPC (pADMPC) は、炎症性サイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) で処理すると免疫抑制因子である GBP4 と IL-1RA を高発現する特徴を有していた。次に、根分岐部 2 級病変を有するマイクロミニブタ歯周炎モデルを確立し、pADMPC の他家移植と自家移植による歯槽骨の再生効果を比

較検討した。μCT を用いて歯槽骨再生能力を 3 次元画像で解析した結果、pADMPC の他家移植は自家移植と同程度の歯槽骨再生効果を有することが確認された。本研究の成果により、ADMPC が持つ免疫調節能力は他家移植においても歯周組織の機能回復に効果が見込まれた。

本研究により、歯周病治療において ADMPC を用いた他家移植療法の有効性が示され、再生医療へ大きく貢献することが期待できる。したがって、本論文は、博士（歯学）の学位に相応しいものと判定する。